

УДК 616.72-002: 577.122.8
DOI 10.17721/1728_2748.2020.81.64-68

О. Короткий, канд. біол. наук,
Л. Кот, канд. біол. наук,
К. Дворщенко, д-р біол. наук,
Л. Остапченко, д-р біол. наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ОКИСНА МОДИФІКАЦІЯ БІЛКІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОАРТРИТУ ТА СУМІСНОГО ВВЕДЕННЯ ХОНДРОПРОТЕКТОРА ТА МУЛЬТИПРОБІОТИКА

Однією з актуальних проблем сучасної медицини є захворювання суглобів. Серед них важливе місце займають остеоартрити. Формування остеоартритів супроводжується розвитком запалення, що призводить до пошкодження всіх структур суглобу. Важливу роль у запальних процесах відіграє інтенсифікація вільнорадикальних процесів. По мірі розвитку захворювання суглоби втрачають рухливість, що призводить до зниження якості життя хворих та розвитку інвалідності. У зв'язку із цим актуальним є пошук препаратів, які б мали регенераційні, протизапальні й антирадикальні властивості.

Проаналізовано сумісну дію хондроїтин сульфату та мультипробіотика на вміст продуктів окисної модифікації білків і рівень сульфгідрильних груп у сироватці крові щурів за умов моноіодацетат-індукованого остеоартриту.

Дослідження проведені на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 180–240 г із дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах. Модель експериментального остеоартриту створювали шляхом введення в колінну зв'язку 1 мг моноіодацетату натрію. У ролі терапевтичних агентів використовували хондроїтин сульфат та мультипробіотик. Уміст продуктів окисної модифікації білків визначали за рівнем карбонільних похідних, які виявляються в реакції з 2,4-динітрофенілгідрaziном. Рівень загальних, білок-зв'язаних та небілкових сульфгідрильних груп вимірювали за методом Елмана.

Встановлено, що при моноіодацетат-індукованому остеоартриті у сироватці крові щурів зростає вміст продуктів окисної модифікації білків. Зростає рівень нейтральних альдегідних продуктів ($E_{\text{max}} = 356$ нм) – у 2,5 раза та нейтральних кетонних продуктів ($E_{\text{max}} = 370$ нм) відповідно – в 2,1 раза порівняно з контролем. За тих же умов експерименту у сироватці крові кількість основних альдегідних продуктів ($E_{\text{max}} = 430$ нм) збільшується в 1,9 раза, при цьому вміст основних кетонних продуктів ($E_{\text{max}} = 530$ нм) зростає в 1,7 раза порівняно з показниками контрольної групи. При експериментальному остеоартриті у сироватці крові вміст сульфгідрильних груп знижується: небілкових SH-груп – в 1,5 раза, білкових і загальних SH-груп – в 1,7 раза відносно контролю. Це свідчить про порушення окисно-антиоксидантної рівноваги та розвиток окисного стресу в організмі при експериментальному остеоартриті. Показано, що при сумісному введенні хондроїтин сульфату та мультипробіотика тваринам з експериментальним остеоартритом зазначені вище показники частково відновлювалися.

Ключові слова: експериментальний остеоартрит, хондроїтин сульфат, мультипробіотик, окисна модифікація білків, сироватка крові.

Вступ. Нині патологія суглобів є однією з актуальних проблем сучасної медицини, а профілактика та лікування має першочергове значення для збереження фізичної активності та дієздатності хворих. Захворювання суглобів мають важливе соціальне значення, оскільки вони роблять найбільший внесок у погіршення загального стану здоров'я та зниження працездатності населення. Наслідком цих змін є системні ускладнення, прогресуюча інвалідність, що загальноспричинює високі соціально-економічні витрати [1, 2]. Серед захворювань суглобів важливе місце займають остеоартрити, які є гетерогенною групою захворювань різної етіології (вікові зміни, механічні травми, інфекційні захворювання, метаболічні порушення тощо), але з подібними біологічними, морфологічними і клінічними наслідками, за яких до патологічного процесу залучаються всі структури суглоба [3–5].

Розвиток і прогресування остеоартриту пов'язані із запальними процесами та дистрофічними змінами хрящової тканини, що призводить до деформації кісткової тканини й атрофії м'язів ураженого суглобу. Пошкодження хряща пов'язано зі зниженням вмісту хондроїтин сульфату, який є одним з основних компонентів екстрацелюлярного матриксу хрящової тканини. Він входить до складу протеогліканових комплексів основної речовини хряща та виконує важливу роль у підтримці його пружності та щільності [6–8]. З огляду на це дослідження препаратів, в основі яких хондроїтин сульфат, є перспективним у профілактиці та лікуванні захворювань суглобів [9].

Серед досліджень останніх років з'являються дані про потенціальний взаємозв'язок між розвитком остеоартритів та станом мікрофлори травної системи [10–13]. Відомо, що дисбіоз кишкової мікробіоти тісно пов'язаний

із патогенезом низки метаболічних і запальних захворювань, тому, відповідно, він може бути задіяний у розвитку остеоартритів. Зважаючи на це, актуальним питанням є дослідження участі кишкової мікрофлори у розвитку захворювань суглобів.

Аналіз літературних даних й отримані нами результати свідчать, що мультипробіотичний препарат "Симбітер[®]" здатен підтримувати та відновлювати нормобіоз шлунково-кишкового тракту (ШКТ) на різних експериментальних моделях [14, 15]. Здатність мультипробіотика ліквідувати колонізацію ШКТ умовно-патогенною мікрофлорою запобігає утворенню джерел запалення. Відповідно, цікавим є вивчення дії зазначеного мультипробіотика на розвиток остеоартриту, механізми формування якого пов'язані із запальними процесами.

Мета дослідження – проаналізувати сумісну дію хондроїтин сульфату та мультипробіотика на вміст продуктів окисної модифікації білків і рівень сульфгідрильних груп у сироватці крові щурів за умов моноіодацетат-індукованого остеоартриту.

Об'єкт та методи досліджень. Усіх тварин розділили на п'ять експериментальних груп. Перша група – контроль: тваринам у перший день вводили в колінну зв'язку 0,05 мл 0,9-відсоткового розчину NaCl та щоденно протягом 14 діб з 8-ої по 22-гу добу вводили пергастрально 1 мл питної води в перерахунок на 1 кг маси тіла тварини. Друга група – хондроїтин сульфат (контроль на введення препарату): вводили внутрішньом'язово препарат "Драстоп" ("УОРЛД МЕДИЦИН ЛІМІТЕД", Велика Британія), основною складовою якого є хондроїтин сульфат натрію, 1 раз на добу протягом 25 діб. Третя група – мультипробіотик (контроль на введення препарату): тваринам у перший день вводили в колінну зв'язку

0,05 мл 0,9-відсоткового розчину NaCl та щоденно протягом 14 діб, з 8-ої по 22-гу добу вводили пергастрально мультипробіотик "Симбітер®" ("Пролісок", Україна) у дозі 140 мг/кг, розведений в 1 мл питної води на 1 кг маси тварини. Четверта група – модель остеоартриту: щурам у перший день вводили в колінну зв'язку 1 мг моноіодацетат натрію (МІА), розчиненого у 0,05 мл 0,9-відсоткового розчину NaCl [16] та щоденно протягом 14 діб вводили пергастрально 1 мл питної води в перерахунок на 1 кг маси тварини. П'ята група – остеоартрит + хондроїтин сульфат + мультипробіотик: тваринам вводили в перший день в колінну зв'язку 1 мг моноіодацетат натрію, розчиненого у 0,05 мл 0,9-відсоткового розчину NaCl, вводили внутрішньом'язово хондроїтин сульфат 1 раз на добу протягом 25 діб та пергастрально мультипробіотик у дозі 140 мг/кг, розведений в 1 мл питної води на 1 кг маси тварини. Тварин умертвляли на 30 добу після початку експерименту згідно із протоколом етичного комітету, після чого швидко робили забір крові. Кров інкубували в термостаті при 37°C протягом 30 хв, після чого центрифугували 1000 g протягом 15 хв. Сироватку відбирали у пластикові мікропробірки та зберігали при –71°C не більше трьох місяців до початку подальших досліджень. Загальна кількість тварин, залучених до експериментальних досліджень, становила 50 особин.

Уміст продуктів окисної модифікації білків (ОМБ) визначали за рівнем карбонільних похідних, які виявляються в реакції з 2,4-динітрофенілгідразином [17]. Рівень загальних, білок-зв'язаних та небілкових сульфгідрильних груп вимірювали за методом Елмана [18]. Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики.

Результати та їхнє обговорення. Невід'ємною складовою формування запалення є розвиток окисного стресу, що виникає внаслідок порушення окисно-антиоксидантної рівноваги. Зазначений процес може бути наслідком як нестачі системи антиоксидантного захисту, так і надмірного утворення вільних радикалів [19]. Наприклад, при розвитку та прогресуванні запалення у суглобах розвивається окисний стрес, що виникає внаслідок постійної генерації вільних радикалів активованими фагоцитами та за рахунок гіпоксичних процесів при роботі суглобів, що призводить до пошкодження всіх структурних елементів суглобу (хрящової, кісткової, присуглобової тканини, синовіальної рідини) [20, 21].

Найбільш ранній індикатор окисного стресу – окисна деструкція білків, які є основними мішенями для радикалів та двохелектронних окислювачів у біологічних системах [22, 23]. Вільні радикали атакують білки по всій довжині поліпептидного ланцюга, порушуючи не тільки первинну, але і вторинну та третинну їхню структуру, що призводить до агрегації або фрагментації білкової молекули. Інтенсивність окисної модифікації білків визначається особливостями їхнього амінокислотного складу.

Акцепторними групами, що здатні перехоплювати електрони, взаємодіючи з активними формами кисню й утворювати аніон-радикали, можуть бути дисульфідні, сульфгідрильні, карбонільні, карбоксильні й аміногрупи білків. Модифікація білків може призвести до підвищення гідрофільності бічного ланцюга, фрагментації бічного й основного ланцюга, агрегації за рахунок ковалентних поперечних зв'язків або гідрофобних взаємодій, розгортанню білка та зміни конформації, до змінених взаємодій з біологічними партнерами та зміненого обертання. Утворення та накопичення таких модифікованих білків порушує їхнє функціонування, що призводить до розвитку різних патологічних станів та формування захворювань [24]. Згідно з даними літератури, окисно-модифіковані білки можуть перебувати в живих організмах досить тривалий час (години, дні та навіть роки (наприклад ліпофусцин)), тоді як вільні радикали, продукти перекисного окиснення ліпідів існують у вільному стані набагато коротший період. У зв'язку із цим окисно-модифіковані білки є відносно стабільним діагностичним параметром їхнього структурно-функціонального стану та можуть відігравати роль маркерів формування патологічних процесів як на локальному рівні, так і на рівні цілого організму.

У ході проведених експериментальних досліджень встановлено, що у щурів при моноіодацетат-індукованому остеоартриті у сироватці крові вміст продуктів окисної модифікації білків зростає (табл. 1). Зокрема, збільшується рівень нейтральних альдегідних продуктів ($E_{\max} = 356$ нм) – в 2,5 раза та нейтральних кетонних продуктів ($E_{\max} = 370$ нм) відповідно – в 2,1 раза порівняно з контролем. За тих же умов експерименту у сироватці крові кількість основних альдегідних продуктів ($E_{\max} = 430$ нм) збільшується в 1,9 раза відносно контрольної групи тварин, при цьому вміст основних кетонних продуктів ($E_{\max} = 530$ нм) зростає в 1,7 раза порівняно з показниками контрольної групи тварин (табл. 1).

Показано, що при сумісному введенні хондроїтин сульфату та мультипробіотика щурам з експериментальним остеоартритом у сироватці крові зменшується рівень окисної модифікації білків: нейтральних альдегідних продуктів ($E_{\max} = 356$ нм) – в 1,8 раза та нейтральних кетонних продуктів ($E_{\max} = 370$ нм) відповідно – в 1,7 раза відносно параметрів групи тварин з патологією (табл. 1). За тих же умов експерименту у сироватці крові кількість основних альдегідних продуктів ($E_{\max} = 430$ нм) знижується в 1,5 раза, при цьому вміст основних кетонних продуктів ($E_{\max} = 530$ нм) зменшується в 1,4 раза відносно значень групи тварин з експериментальним остеоартритом (табл. 1).

Виявлено, що введення щурам як хондроїтин сульфату, так і мультипробіотика не впливає на вміст продуктів окисної модифікації білків у сироватці крові контрольної групи щурів (табл. 1).

Таблиця 1. Уміст продуктів окисної модифікації білків у сироватці крові щурів при експериментальному остеоартриті, ум. од. $\times$ мг білка⁻¹ ($M \pm m$, $n = 10$)

Показник	Продукти нейтрального характеру		Продукти основного характеру	
	356 нм, альдопохідні	370 нм, кетопохідні	430 нм, альдопохідні	530 нм, кетопохідні
Групи тварин				
Контроль	0,143 $\pm$ 0,013	0,115 $\pm$ 0,011	0,072 $\pm$ 0,006	0,042 $\pm$ 0,004
Хондроїтин сульфат	0,145 $\pm$ 0,014	0,112 $\pm$ 0,011	0,071 $\pm$ 0,007	0,041 $\pm$ 0,004
Мультипробіотик	0,138 $\pm$ 0,013	0,103 $\pm$ 0,009	0,069 $\pm$ 0,006	0,039 $\pm$ 0,003
Остеоартрит	0,347 $\pm$ 0,033*	0,238 $\pm$ 0,021*	0,134 $\pm$ 0,012*	0,073 $\pm$ 0,006
Остеоартрит + хондроїтин сульфат + мультипробіотик	0,193 $\pm$ 0,018#*	0,139 $\pm$ 0,013#*	0,088 $\pm$ 0,008#	0,053 $\pm$ 0,004#*

Примітки: * – $p < 0,05$ відносно контролю; # – $p < 0,05$ відносно групи тварин з остеоартритом

Показником білкової модифікації є окиснення їхніх сульфгідрильних груп, яке може відбуватись як прямим, так і ферментативним шляхом за участі ферменту глутатіонпероксидази та гідроперекисей ліпідів [25]. Насамперед окисненню піддаються саме сульфгідрильні групи білків, що оберігає від окиснення інші функціональні групи та молекули. Сульфгідрильні групи входять до складу як високомолекулярних білків (білок-зв'язані SH-групи), так і до низькомолекулярних пептидів (небілкові SH-групи), переважно у складі цистеїнових залишків.

Виявлено, що у щурів при моноіодацетат-індукованому остеоартриті у сироватці крові вміст сульфгідрильних груп знижується: небілкових SH-груп – в 1,5 раза, білкових і загальних SH-груп – в 1,7 раза щодо контролю (табл. 2). Встановлене зниження вмісту сульфгідрильних груп у сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартрити свідчить про накопичення ковалентних зв'язків за участі цистеїну та метіоніну, а також про окиснення SH-груп.

Таблиця 2. Уміст сульфгідрильних (SH-) груп у сироватці крові щурів при експериментальному остеоартриті, мкмоль × мг білка⁻¹ ($M \pm m$, $n = 10$)

Групи тварин	Показник	небілкові SH-групи	білкові SH-групи	загальні SH-групи
Контроль		0,25 ± 0,02	4,37 ± 0,41	4,62 ± 0,43
Хондроїтин сульфат		0,27 ± 0,02	4,32 ± 0,39	4,59 ± 0,41
Мультипробіотик		0,33 ± 0,03*	4,21 ± 0,38	4,53 ± 0,42
Остеоартрит		0,17 ± 0,01*	2,51 ± 0,22*	2,68 ± 0,23*
Остеоартрит + хондроїтин сульфат + мультипробіотик		0,23 ± 0,02#	3,68 ± 0,29#	3,91 ± 0,34#

Примітки: * – $p < 0,05$ відносно контролю; # – $p < 0,05$ відносно групи тварин з остеоартритом.

При сумісному введенні хондроїтин сульфату та мультипробіотика тваринам з експериментальним остеоартритом у сироватці крові спостерігається часткове відновлення рівня сульфгідрильних груп: зростає вміст небілкових груп – в 1,4 раза, білкових і загальних SH-груп – в 1,5 раза відносно групи щурів з патологією (табл. 2).

Показано, що при введенні тваринам контрольної групи хондроїтин сульфату рівень сульфгідрильних груп у сироватці крові залишається в межах контрольних значень. Виявлено, що введення щурам мультипробіотика призводить до зростання у сироватці крові вмісту небілкових сульфгідрильних груп в 1,3 раза порівняно із зазначеним показником контрольної групи тварин (табл. 2). Це пов'язано зі здатністю мікроорганізмів, що входять до складу досліджуваного мультипробіотика, утворювати попередника відновленого глутатіону (γ -глутамілцистеїн). Крім того, певні штами бактерій (*Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis* тощо) можуть безпосередньо синтезувати відновлений глутатіон [26–28].

Отже, згідно з отриманими нами результатами встановлено, що при моноіодацетат-індукованому остеоартриті у сироватці крові щурів активуються вільнорадикальні процеси. Оскільки білки є високочутливими до вільнорадикального окиснення, то рівень їхнього окиснення відображає про-/антиоксидантний баланс в організмі. Відповідно, виявлене нами зростання вмісту продуктів окисної модифікації білків може викликати низку негативних наслідків: порушення структурної організації білків, зміни заряду білкової молекули, трансформації чутливості до протеолізу, що може призвести до порушення або втрати функціональної активності білкових молекул (структурної, каталітичної, регуляторної, транспортної, сигнальної, рецепторної тощо). Крім того, утворений пул модифікованих білків робить їх чутливішими до протеолізу, що сприяє подальшій інтенсифікації деструктивних процесів. Окиснені білки здатні відігравати роль джерела вільних радикалів, виснажувати запаси антиоксидантів (глутатіон, аскорбінова кислота). У молекулярних механізмах вільнорадикальних процесів окиснення білків може спричинити деструкцію інших молекул (ліпіди, ДНК), що сприятиме прогресуванню патологічних станів та розвитку захворювань [29, 30].

Виявлене зниження утворення окиснених білкових молекул у сироватці крові при сумісному введенні хонд-

роїтин сульфату та мультипробіотика щурам при експериментальному остеоартриті пов'язано із широким спектром біологічної активності досліджуваних препаратів. Наприклад, хондроїтин сульфат володіє вираженою гідрофільністю за рахунок наявності карбоксильної та сульфатної груп, що сприяє нормальному функціонуванню хряща та збереженню його еластичності. Він активує анаболічні процеси за рахунок стимуляції синтезу протеогліканів і колагену, а також пригнічує синтез ферментів деструкції хряща, що загалом сприяє відновленню структурно-функціонального стану хрящової тканини. Крім того, хондроїтин сульфат характеризується антизапальними (зменшує біосинтез різних прозапальних молекул) й антиоксидантними властивостями (здатність хелатувати іони перехідних металів, що беруть безпосередню участь в ініціюванні реакцій Фентона та Хабер – Вейса) [31, 32].

Механізм дії мультипробіотика "Симбітер®" базується на його здатності ефективно ліквідовувати мікроекологічні порушення за рахунок високої антагоністичної активності щодо широкого спектра патогенних й умовно-патогенних мікроорганізмів та зменшувати запальні процеси на локальному та системному рівнях організму. Зазначений мультипробіотик містить штами бактерій родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* та *Propionibacterium*, що мають різні механізми біологічної активності та створюють умови для формування взаємовигідних симбіотичних відносин між окремими бактеріальними компонентами. Крім того, бактеріальні штами у складі мультипробіотика "Симбітер®" є активними продуцентами біологічно активних метаболітів: вітамінів, полісахаридів, коротколанцюгових жирних кислот, глікопептидів, антиоксидантів, імуномодуляторів, травних ферментів, а також вони беруть участь у деградації токсинів, алергенів, що розширює спектр біологічної активності препарату [33, 34].

Висновки. Встановлено, що при експериментальному остеоартриті у сироватці крові щурів зростає вміст продуктів окисної модифікації білків, що свідчить про зсув окисно-антиоксидантної рівноваги у прооксидантний бік. При сумісному введенні хондроїтин сульфату та мультипробіотика щурам з експериментальним остеоартритом відбувається часткове зниження вмісту продуктів окиснення білкових молекул у сироватці крові тварин.

Список використаних джерел:

1. The Link Between Inflammaging and Degenerative Joint Diseases / E. Rezus, A. Cardoneanu, A. Burlui et al. // *Int J Mol Sci.* – 2019 Jan. 31. – 20(3). – P. 614.
2. Abramoff B. Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options / B. Abramoff, F. E. Caldera // *Med Clin North Am.* – 2020 Mar. – 104(2). – P. 293–311.
3. Man G. S. Osteoarthritis pathogenesis – a complex process that involves the entire joint / G. S. Man, G. Mologhianu // *J. Med. Life.* – 2014. – Vol. 7, № 1. – P. 37–41.
4. O'Neill T. W. Update on the epidemiology, risk factors and disease outcomes of osteoarthritis / T. W. O'Neill, P. S. McCabe, J. McBeth // *Best Pract Res Clin Rheumatol.* – 2018 Apr. – 32(2). – P. 312–326.
5. Hunter D. J. Osteoarthritis / D. J. Hunter, S. Bierma-Zeinstra // *Lancet.* – 2019 Apr. 27. – 393(10182). – P. 1745–1759.
6. Martel-Pelletier J. Discrepancies in composition and biological effects of different formulations of chondroitin sulfate / J. Martel-Pelletier, A. Farran, E. Montell et al. // *Molecules.* – 2015. – Vol. 20, № 3. – P. 4277–4289.
7. Chondroitin sulphate: a focus on osteoarthritis / M. Bishnoi, A. Jain, P. Hurkat, S. K. Jain // *Glycoconj. J.* – 2016. – Vol. 33, № 5. – P. 693–705.
8. Theocharis AD. The extracellular matrix as a multitasking player in disease / A. D. Theocharis, D. Manou, N. K. Karamanos // *FEBS J.* – 2019 Aug. – 286(15). – P. 2830–2869.
9. Honvo G. Update on the role of pharmaceutical-grade chondroitin sulfate in the symptomatic management of knee osteoarthritis / G. Honvo, O. Bruyère, J. Y. Reginster // *Aging Clin Exp Res.* – 2019 Aug. – 31(8). – 1163–1167.
10. Vitetta L. The gastrointestinal microbiome and musculoskeletal diseases: a beneficial role for probiotics and prebiotics / L. Vitetta, S. Coulson, A. W. Linnane, H. Butt // *Pathogens.* – 2013. – Nov. 14. – 2(4). – P. 606–626.
11. Bravo-Blas A. Microbiota and arthritis: correlations or cause? / A. Bravo-Blas, H. Wessel, S. Milling // *Curr. Opin. Rheumatol.* – 2016. – Vol. 28(2). – P. 161–167.
12. Breban M. Gut microbiota and inflammatory joint diseases / M. Breban // *Joint Bone Spine.* – 2016 Dec. – 83(6). – P. 645–649.
13. Biver E. Gut microbiota and osteoarthritis management: An expert consensus of the European society for clinical and economic aspects of osteoporosis, osteoarthritis and musculoskeletal diseases (ESCEO) / E. Biver, F. Berenbaum, A. M. Valdes, Araujo de Carvalho I et al. // *Ageing Res Rev.* – 2019 Nov. – 55. – 100946.
14. Вплив окисного стресу на рівень експресії генів *TGF-β* і *HGF* у печінці щурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоридрії та за введення мультіпробіотику Симбітер / К. О. Дворченко та ін. // *Укр. біохім. журн.* – 2013. – Т. 85, № 5. – С. 114–123.
15. Абдулахад К. Ф. А. Дослідження впливу мультіпробіотиків групи "Симбітер" на секреторну функцію шлунка у щурів в умовах тривалої гіпергастринемії: автореф. дис. ... канд. біол. наук : 03.00.13 / Кусай Ф. Абдулахад Абдулахад ; Київський нац. ун-т ім. Тараса Шевченка. – К., 2012. – 20 с.
16. Baragi V. M. A new class of potent matrix metalloproteinase 13 inhibitors for potential treatment of osteoarthritis: Evidence of histologic and clinical efficacy without musculoskeletal toxicity in rat models / V. M. Baragi, G. Becher, A. M. Bendele et al. // *Arthritis. Rheum.* – 2009. – Vol. 60(7). – P. 2008–2018.
17. Окислительные модификации белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е. Е. Дубинина, С. О. Бурмистров, Д. А. Ходов, И. Г. Поротов // *Вопросы медицинской химии.* – 1995. – № 1. – С. 24–26.
18. Ellman G. Tissue sulfhydryl groups / G. Ellman // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1959. – Vol. 82, №1. – P. 70–77.
19. Lauridsen C. From oxidative stress to inflammation: redox balance and immune system / C. Lauridsen // *Poult Sci.* – 2019 Oct. 1. – 98(10). – P. 4240–4246.
20. Drevet S. Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 involvement in osteoarthritis / S. Drevet, G. Gavazzi, L. Grange et al. // *Exp. Gerontol.* – 2018. – Vol. 111. – P. 107–117.
21. The evaluation of oxidative stress in osteoarthritis / O. M. Zahan, O. Serban, C. Gherman, D. Fodor // *Med Pharm Rep.* – 2020 Jan. – 93(1). – P. 12–22.
22. Hawkins C. L. Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications / C. L. Hawkins, M. J. Davies // *J Biol Chem.* – 2019 Dec. 20. – 294(51). – P. 19683–19708.
23. Causative Links between Protein Aggregation and Oxidative Stress: A Review / E. Lévy, El. Banna N., D. Baille et al. // *Int J Mol Sci.* – 2019 Aug. 9. – 20(16). – P. 3896.
24. Sánchez-Rodríguez M. A. Oxidative Stress Indexes for Diagnosis of Health or Disease in Humans / M. A. Sánchez-Rodríguez, V. M. Mendoza-Núñez // *Oxid Med Cell Longev.* – 2019 Nov. 25; 2019: 4128.
25. Baba S. P. Role of thiols in oxidative stress / S. P. Baba, A. Bhatnagar // *Curr Opin Toxicol.* – 2018 Feb. – 7. – P. 133–139.
26. The gut microbiota modulates host amino acid and glutathione metabolism in mice / A. Mardinoglu, S. Shoaib, M. Bergentall et al. // *Mol Syst Biol.* – 2015 Oct. 16. – 11(10). – P. 834.
27. Schmach M. Microbial production of glutathione / M. Schmach, E. Lorenz, M. Senz // *World J Microbiol Biotechnol.* – 2017 Jun. – 33(6). – P. 106.
28. Metabolic engineering of *Lactococcus lactis* for high level accumulation of glutathione and S-adenosyl-L-methionine / C. Xu, Z. Shi, J. Shao et al. // *World J. Microbiol Biotechnol.* – 2019 Nov. 14. – 35(12). – P. 185.
29. Lipoxidation adducts with peptides and proteins: deleterious modifications or signaling mechanisms? / R. M. Domingues, P. Domingues, T. Melo et al. // *J. Proteomics.* – 2013. – Vol. 92. – P. 110–131.
30. Davies M. J. Protein oxidation and peroxidation / M. J. Davies // *Biochem. J.* – 2016 Apr. 1. – 473(Pt 7). – P. 805–825.
31. Effect of the chelation of metal cation on the antioxidant activity of chondroitin sulfates / K. Ajisaka, Y. Oyanagi, T. Miyazaki, Y. Suzuki // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 2016. – Vol. 80(6). – P. 1179–1185.
32. Chondroitin sulphate inhibits NF-κB activity induced by interaction of pathogenic and damage associated molecules / T. V. Stabler, Z. Huang, E. Montell et al. // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2017. – Vol. 25(1). – P. 166–174.
33. Янковський Д. С. Інноваційні технології оздоровлення мікробіому людини / Д. С. Янковський, В. П. Ширококов, Г. С. Димент // *Nauka innov.* – 2018. – 14(6). – С. 5–17.
34. How Probiotics Affect the Microbiota / G. Wieërs, L. Belkhir, R. Enaud et al. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32010640> // *Front Cell Infect. Microbiol.* – 2020 Jan. 15. – 9. – P. 454.

References:

1. Rezus E., Cardoneanu A., Burlui A. et al. The Link Between Inflammaging and Degenerative Joint Diseases. *Int J Mol Sci.* 2019 Jan. 31; 20(3): 614.
2. Abramoff B., Caldera F. E. Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options. *Med Clin North Am.* 2020 Mar.; 104(2): 293–311.
3. Man G. S., Mologhianu G. Osteoarthritis pathogenesis – a complex process that involves the entire joint. *J. Med. Life.* 2014. Vol. 7, № 1. P. 37–41.
4. O'Neill T. W., McCabe P. S., McBeth J. Update on the epidemiology, risk factors and disease outcomes of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2018 Apr.; 32(2): 312–326.
5. Hunter D. J., Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis. *Lancet.* 2019 Apr. 27; 393(10182): 1745–1759.
6. Martel-Pelletier J., Farran A., Montell E. et al. Discrepancies in composition and biological effects of different formulations of chondroitin sulfate. *Molecules.* 2015. Vol. 20, № 3. P. 4277–4289.
7. Bishnoi M., Jain A., Hurkat P., Jain S. K. Chondroitin sulphate: a focus on osteoarthritis. *Glycoconj. J.* 2016. Vol. 33, № 5. P. 693–705.
8. Theocharis A. D., Manou D., Karamanos N. K. The extracellular matrix as a multitasking player in disease. *FEBS J.* 2019 Aug.; 286(15): 2830–2869.
9. Honvo G., Bruyère O., Reginster J. Y. Update on the role of pharmaceutical-grade chondroitin sulfate in the symptomatic management of knee osteoarthritis. *Aging Clin Exp Res.* 2019 Aug.; 31(8): 1163–1167.
10. Vitetta L., Coulson S., Linnane A. W., Butt H. The gastrointestinal microbiome and musculoskeletal diseases: a beneficial role for probiotics and prebiotics. *Pathogens.* 2013 Nov. 14; 2(4): 606–626.
11. Bravo-Blas A., Wessel H., Milling S. Microbiota and arthritis: correlations or cause? *Curr. Opin. Rheumatol.* 2016. Vol. 28(2). P. 161–167.
12. Breban M. Gut microbiota and inflammatory joint diseases. *Joint Bone Spine.* 2016 Dec.; 83(6): 645–649.
13. Biver E., Berenbaum F., Valdes A. M. et al. Gut microbiota and osteoarthritis management: An expert consensus of the European society for clinical and economic aspects of osteoporosis, osteoarthritis and musculoskeletal diseases (ESCEO). *Ageing Res Rev.* 2019 Nov.; 55: 100946.
14. Vplyv oksynohu stresu na riven ekspresii geniv *TGF-β* i *HGF* u pechintsi shchuriv v umovakh tryvaloi shlunkovoi hipokhlordirii ta za vvedennia multyprobiotyky Cymbiter / K. O. Dvorshchenko ta in. *Ukr. biokhim. zhurn.* 2013. T. 85, № 5. S. 114–123.
15. Abdulakhad K. F. A. Doslidzhennia vplyvu multyprobiotykyv hrupy "Symbiter" na sekretornu funktsiu shlunka u shchuriv v umovakh tryvaloi hiperhastrynemii: avtoref. dys. ...kand. biol. nauk: 03.00.13 / Kusi F. Abdulakhad Abdulakhad ; Kyivs. nats. un-t im. Tarasa Shevchenka. Kyiv, 2012. 20 s.
16. Baragi V. M., Becher G., Bendele A. M. et al. A new class of potent matrix metalloproteinase 13 inhibitors for potential treatment of osteoarthritis: Evidence of histologic and clinical efficacy without musculoskeletal toxicity in rat models. *Arthritis. Rheum.* 2009. Vol. 60(7). P. 2008–2018.
17. Dubinina E. E., Burmistrov S. O., Hodov D. A., Porotov I. G. Okislitelnye modifikatsii belkov syvorotki krovi cheloveka, metod ee opredeleniya. *Voprosy meditsinskoy khimii.* 1995. # 1. S. 24–26.
18. Ellman G. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959. Vol. 82, № 1. P. 70–77.
19. Lauridsen C. From oxidative stress to inflammation: redox balance and immune system. *Poult Sci.* 2019 Oct. 1; 98(10): 4240–4246.
20. Drevet S., Gavazzi G., Grange L. et al. Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 involvement in osteoarthritis. *Exp. Gerontol.* 2018. Vol. 111. P. 107–117.
21. Zahan O. M., Serban O., Gherman C., Fodor D. The evaluation of oxidative stress in osteoarthritis. *Med Pharm Rep.* 2020 Jan.; 93(1): 12–22.
22. Hawkins C. L., Davies M. J. Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. *J Biol Chem.* 2019 Dec. 20; 294(51): 19683–19708.
23. Lévy E., El Banna N., Baille D. et al. Causative Links between Protein Aggregation and Oxidative Stress: A Review. *Int J Mol Sci.* 2019 Aug. 9; 20(16): 3896.

23. Sánchez-Rodríguez M. A., Mendoza-Núñez V. M. Oxidative Stress Indexes for Diagnosis of Health or Disease in Humans. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 Nov. 25; 2019: 4128.
24. Baba S. P. and Bhatnagar A. Role of thiols in oxidative stress. *Curr Opin Toxicol*. 2018 Feb.; 7: 133–139.
25. Mardinoglu A., Shoae S., Bergentall M., Ghaffari P. et al. The gut microbiota modulates host amino acid and glutathione metabolism in mice. *Mol Syst Biol*. 2015 Oct. 16; 11(10): 834.
26. Schmacht M., Lorenz E., Senz M. Microbial production of glutathione. *World J Microbiol Biotechnol*. 2017 Jun;33(6):106.
27. Xu C., Shi Z., Shao J. et al. Metabolic engineering of *Lactococcus lactis* for high level accumulation of glutathione and S-adenosyl-L-methionine // *World J Microbiol Biotechnol*. 2019 Nov. 14; 35(12): 185.
28. Domingues R. M., Domingues P., Melo T. et al. Lipoxidation adducts with peptides and proteins: deleterious modifications or signaling mechanisms? *J. Proteomics*. 2013. Vol. 92. P. 110–131.
29. Davies M. J. Protein oxidation and peroxidation. *Biochem. J*. 2016 Apr. 1; 473(Pt 7): 805–825.

30. Ajsaka K., Oyanagi Y., Miyazaki T., Suzuki Y. Effect of the chelation of metal cation on the antioxidant activity of chondroitin sulfates // *Biosci Biotechnol Biochem*. 2016. Vol. 80(6). P. 1179–1185.
31. Stabler T. V., Huang Z., Montell E. et al. Chondroitin sulphate inhibits NF- κ B activity induced by interaction of pathogenic and damage associated molecules. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017. Vol. 25(1). P. 166–174.
32. Iankovsky D. S., Shyrobokov V. P., Dymant H. S. Innovatsiini tekhnologii ozdorovlennia mikrobiomu liudyny. *Nauka innov*. 2018, 14(6): 5–17.
33. Wieers G., Belkhir L., Enaud R. et al. How Probiotics Affect the Microbiota. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32010640> *Front Cell Infect. Microbiol*. 2020 Jan. 15; 9: 454.

Надійшла до редколегії 18.05.2020
Отримано виправлений варіант 19.06.2020
Підписано до друку 19.06.2020

Received in the editorial 18.05.2020
Received a revised version on 19.06.2020
Signed in the press on 19.06.2020

А. Короткий, канд. биол. наук,
Л. Кот, канд. биол. наук,
Е. Дворщенко, д-р биол. наук,
Л. Остапченко, д-р биол. наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОАРТРИТА И СОВМЕСТНОГО ВВЕДЕНИЯ ХОНДРОПРОТЕКТОРА И МУЛЬТИПРОБИОТИКА

Одной из актуальных проблем современной медицины является заболевания суставов. Среди них важное место занимают остеоартриты. Формирование остеоартритов сопровождается развитием воспаления, что приводит к повреждению всех структур сустава. Важную роль в воспалительных процессах играет интенсификация свободнорадикальных процессов. По мере развития заболевания суставы теряют подвижность, что приводит к снижению качества жизни больных и развитию инвалидности. В связи с этим актуальным является поиск препаратов, обладающих регенерационными, противовоспалительными и антирадикальными свойствами.

Цель работы – исследовать совместное действие хондроитин сульфата и мультипробиотика на содержание продуктов окислительной модификации белков и уровень сульфгидрильных групп в сыворотке крови крыс в условиях моноиодоацетат-индуцированного остеоартрита.

Исследования проведены на белых нелинейных половозрелых крысах-самцах массой 180–240 г с соблюдением общих этических принципов экспериментов на животных. Модель экспериментального остеоартрита создавали путем введения в коленную связку 1 мг моноиодоацетата натрия. В качестве терапевтических агентов использовали хондроитин сульфат и мультипробиотик. Содержание продуктов окислительной модификации белков определяли по уровню карбонильных производных, проявляющихся в реакции с 2,4-динитрофенилгидразином. Уровень общих, белок-связанных и небелковых сульфгидрильных групп измеряли по методу Элмана.

Установлено, что при моноиодоацетат-индуцированном остеоартрите в сыворотке крови крыс возрастает содержание продуктов окислительной модификации белков. Увеличивается уровень нейтральных альдегидных продуктов ($E_{\text{max}} = 356 \text{ nm}$) – в 2,5 раза и нейтральных кетонных продуктов ($E_{\text{max}} = 370 \text{ nm}$) соответственно – в 2,1 раза по сравнению с контролем. При тех же условиях эксперимента в сыворотке крови количество основных альдегидных продуктов ($E_{\text{max}} = 430 \text{ nm}$) увеличивается в 1,9 раза, при этом содержание основных кетонных продуктов ($E_{\text{max}} = 530 \text{ nm}$) возрастает в 1,7 раза по сравнению с показателями контрольной группы. При экспериментальном остеоартрите в сыворотке крови содержание сульфгидрильных групп снижается: небелковых SH-групп – в 1,5 раза, белковых и общих SH-групп – в 1,7 раза относительно контроля. Это свидетельствует о нарушении окислительно-антиоксидантного равновесия и развитии окислительного стресса в организме при экспериментальном остеоартрите. Показано, что при совместном введении хондроитин сульфата и мультипробиотика животным с экспериментальным остеоартритом вышеуказанные показатели частично восстанавливались.

Ключевые слова: экспериментальный остеоартрит, хондроитин сульфат, мультипробиотик, окислительная модификация белков, сыворотка крови.

O. Korotkyi, Ph. D.,
L. Kot, Ph. D.,
K. Dvorshchenko, Dr. Sci.,
L. Ostapchenko, Dr. Sci.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS IN RAT SERUM UNDER EXPERIMENTAL OSTEOARTHRITIS AND JOINT ADMINISTRATION OF CHONDROPROTECTOR AND MULTIPROBIOTIC

One of the actual problems of modern medicine is joint disease. Among them, osteoarthritis occupies an important place. The formation of osteoarthritis is accompanied by the development of inflammation, which leads to damage to all structures of the joint. An important role in inflammatory processes is played by the intensification of free radical processes. As the disease develops, the joints lose their mobility, which leads to a decrease in the quality of life of patients and the development of disability. In this regard, it is important to search for drugs that have regenerative, anti-inflammatory and antiradical properties.

The aim of our study was to investigate the combined effect of chondroitin sulfate and multiprobiotic on the content of oxidative protein modification products and the level of sulfhydryl groups in rat blood serum under conditions of monoiodoacetate-induced osteoarthritis.

The study included participation of white male non-linear rats (weighing 180–240 g) adherence to the general ethical principles of animal experiments. An experimental osteoarthritis model was created by introducing 1 mg of sodium monoiodoacetate into the knee ligament. Chondroitin sulfate and multiprobiotic were used as therapeutic agents. The content of products of oxidative modification of proteins was determined by the level of carbonyl derivatives, which are manifested in the reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine. The level of total, protein-bound and non-protein sulfhydryl groups was measured by the Elman method.

It was found that under conditions of monoiodoacetate-induced osteoarthritis in the blood serum of rats, the content of products of oxidative modification of proteins increases. The level of neutral aldehyde products ($E_{\text{max}} = 356 \text{ nm}$) is increased by 2.5 times and neutral ketone products ($E_{\text{max}} = 370 \text{ nm}$), respectively, by 2.1 times compared to the control. Under the same experimental conditions in the blood serum, the amount of basic aldehyde products ($E_{\text{max}} = 430 \text{ nm}$) increases by 1.9 times, while the content of the main ketone products ($E_{\text{max}} = 530 \text{ nm}$) increases by 1.7 times compared to the control groups. In experimental osteoarthritis in the blood serum, the content of sulfhydryl groups decreases: non-protein SH-groups – 1.5 times, protein and general SH-groups – 1.7 times relative to the control. This indicates disturbance of the oxidative-antioxidant balance and the development of oxidative stress in the organism during experimental osteoarthritis. It was shown that the combined administration of chondroitin sulfate and multiprobiotics in animals with experimental osteoarthritis partially restored the above parameters.

Keywords: experimental osteoarthritis, chondroitin sulfate, multiprobiotic, oxidative modification of proteins, blood serum.